

4318

REMEDIAL AGENT FOR FATTY LIVER**Publication number:** JP2002220345**Publication date:** 2002-08-09**Inventor:** NOGUCHI TAKESHI; HIROTA KOTARO; TANAKA MASASHI**Applicant:** SUMITOMO PHARMA**Classification:**

- **international:** A61K45/00; A61K31/192; A61K31/216; A61K31/437; A61K31/4468; A61K31/496; A61K31/513; A61K45/06; A61P1/16; A61P3/06; A61K45/00; A61K31/185; A61K31/21; A61K31/4353; A61K31/4468; A61K31/496; A61K31/513; A61P1/00; A61P3/00; (IPC1-7): A61K45/00; A61K31/192; A61K31/216; A61K31/437; A61K31/4468; A61K31/496; A61K31/513; A61K45/06; A61P1/16; A61P3/06

- **European:**

Application number: JP20010015602 20010124**Priority number(s):** JP20010015602 20010124[Report a data error here](#)**Abstract of JP2002220345**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a medicine for preventing and/or treating fatty liver that can prevent or cure fat accumulation in liver, decrease blood lipid, and can be used for a patient to whom a MTP inhibitor is administered, and also to provide a medicine for treating hyperlipidemia. **SOLUTION:** This invention relates to a medicine for preventing and/or treating fatty liver containing a PPAR& α activator as an active ingredient for a patient to whom a MTP inhibitor is administered, and also a medicine for treating hyperlipidemia containing a MTP inhibitor and PPAR& α activator as its active ingredients.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-220345

(P2002-220345A)

(43)公開日 平成14年8月9日(2002.8.9)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テ-マコード(参考)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 45/00

4 C 0 8 4

31/192

31/192

4 C 0 8 6

31/216

31/216

4 C 2 0 6

31/437

31/437

31/4468

31/4468

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願2001-15602(P2001-15602)

(71)出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(22)出願日

平成13年1月24日(2001.1.24)

(72)発明者 野口 肇

大阪市此花区春日出中3-1-98 住友製
薬株式会社内

(72)発明者 廣田 浩太郎

大阪市此花区春日出中3-1-98 住友製
薬株式会社内

(74)代理人 100095832

弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 脂肪肝改善剤

(57)【要約】

【課題】肝臓における脂肪蓄積を予防もしくは治療する
ことができ、かつ血中脂質を低下させることができる、
MTP阻害剤の投与患者に用いられる、脂肪肝の予防お
よび／または治療剤；ならびに高脂血症を治療すること
ができる、高脂血症治療剤を提供すること。

【解決手段】MTP阻害剤の投与患者に用いられる、PPAR α 活性化剤を有効成分として含有してなる、脂肪
肝の予防および／または治療剤；ならびにMTP阻害剤
とPPAR α 活性化剤とを有効成分として含有してなる
高脂血症治療剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 MTP (ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質; microsomal triglyceride transfer protein) 阻害剤の投与患者に用いられる、PPAR α (ペルオキソーム増殖因子活性化レセプター α ; Peroxisome proliferator-activated receptor α) 活性化剤を有効成分として含有してなる、脂肪肝の予防および/または治療剤。

【請求項2】 MTP阻害剤が、BMS-201038、BAY13-9952、CP-10447、R 103757 および WM-1159 からなる群より選択された化合物である、請求項1記載の予防および/または治療剤。

【請求項3】 PPAR α 活性化剤が、フェノフィブラーート (Fenofibrate)、WY-14643、ベザフィブラーート (Bezafibrate)、クロフィブラーート (Clofibrate)、クリノフィブラーート (Clinofibrate)、8(S)-HET E、シプロフィブラーート (Ciprofibrate) および ゲンフィブロジル (Gemfibrozil) からなる群より選ばれた化合物である、請求項1もしくは2記載の予防および/または治療剤。

【請求項4】 PPAR α 活性化剤が、クリノフィブラーートである、請求項1～3いずれかに記載の予防および/または治療剤。

【請求項5】 脂肪肝が、MTP阻害剤の副作用として惹起される脂肪肝である、請求項1～4いずれかに記載の予防および/または治療剤。

【請求項6】 MTP阻害剤と PPAR α 活性化剤とを有効成分として含有してなる高脂血症治療剤。

【請求項7】 MTP阻害剤が、BMS-201038、BAY13-9952、CP-10447、R 103757 および WM-1159 からなる群より選択された化合物である、請求項6記載の高脂血症治療剤。

【請求項8】 PPAR α 活性化剤が、フェノフィブラーート (Fenofibrate)、WY-14643、ベザフィブラーート (Bezafibrate)、クロフィブラーート (Clofibrate)、クリノフィブラーート (Clinofibrate)、8(S)-HET E、シプロフィブラーート (Ciprofibrate) および ゲンフィブロジル (Gemfibrozil) からなる群より選ばれた化合物である、請求項6もしくは7記載の高脂血症治療剤。

【請求項9】 PPAR α 活性化剤が、クリノフィブラーートである、請求項6～8いずれかに記載の高脂血症治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、脂肪肝の予防およ

び/または治療剤、ならびに高脂血症治療剤に関する。さらに詳しくは、肝臓における脂肪蓄積を予防もしくは治療することができ、かつ血中脂質を低下させることができる脂肪肝の予防および/または治療剤、ならびに高脂血症の治療が可能であり、肝臓における脂質の蓄積を抑制することができる高脂血症治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、肥満の増加とともに、高脂血症を罹患した患者が増加している。かかる高脂血症に対する薬剤としては、血中脂質 (コレステロール、トリグリセリドなど) 濃度を下げるために、ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質 (microsomal triglyceride transfer protein) 阻害剤 (以下、MTP阻害剤という) が適用される。

【0003】 しかしながら、前記MTP阻害剤は、血中脂質の低下作用を発揮するものの、肝臓への脂肪蓄積 (脂肪肝) を惹起する場合がある。

【0004】 したがって、脂肪肝を惹起することなく、十分な予防及び治療効果を得ることが可能な医薬品の開発が望まれている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、肝臓における脂肪蓄積を予防もしくは治療することができ、かつ血中脂質を低下させることができる、MTP阻害剤の投与患者に用いられる、PPAR α 活性化剤を有効成分として含有した、脂肪肝の予防および/または治療剤を提供することを目的とする。また、本発明は、高脂血症を治療することができる、MTP阻害剤と PPAR α 活性化剤とを有効成分として含有した高脂血症治療剤を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】 すなわち、本発明は、(1) MTP (ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質; microsomal triglyceride transfer protein) 阻害剤の投与患者に用いられる、PPAR α (ペルオキソーム増殖因子活性化レセプター α ; Peroxisome proliferator-activated receptor α) 活性化剤を有効成分として含有してなる、脂肪肝の予防および/または治療剤、(2) MTP阻害剤が、BMS-201038、BAY13-9952、CP-10447、R 103757 および WM-1159 からなる群より選択された化合物である、前記(1)記載の予防および/または治療剤、(3) PPAR α 活性化剤が、フェノフィブラーート (Fenofibrate)、WY-14643、ベザフィブラーート (Bezafibrate)、クロフィブラーート (Clofibrate)、クリノフィブラーート (Clinofibrate)、8(S)-HET E、シプロフィブラーート (Ciprofibrate) および ゲンフィブロジル (Gemfibrozil) からなる群より選ばれた化合物である。

ラート (Ciprofibrate) およびゲンフィブロジル (Gemfibrozil) からなる群より選ばれた化合物である、前記 [1] もしくは [2] 記載の予防および／または治療剤、[4] PPAR α 活性化剤が、クリノフィブラートである、前記 [1]～[3] いずれかに記載の予防および／または治療剤、[5] 脂肪肝が、MTP阻害剤の副作用として惹起される脂肪肝である、前記 [1]～[4] いずれかに記載の予防および／または治療剤、[6] MTP阻害剤と PPAR α 活性化剤とを有効成分として含有してなる高脂血症治療剤、[7] MTP阻害剤が、BMS-201038、BAY13-9952、CP-10447、R-103757 および WM-1159 からなる群より選択された化合物である、前記 [6] 記載の高脂血症治療剤、[8] PPAR α 活性化剤が、フェノフィブラート、WY-14643、ベザフィブラート、クロフィブラート、クリノフィブラート、8(S)-HETE、シプロフィブラートおよびゲンフィブロジルからなる群より選ばれた化合物である、前記 [6] もしくは [7] 記載の高脂血症治療剤、ならびに [9] PPAR α 活性化剤が、クリノフィブラートである、前記 [6]～[8] いずれかに記載の高脂血症治療剤、に関する。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明者らは、動物および人において、血中脂質を低下させるが、肝臓への脂肪蓄積を惹起することが從来知られているMTP阻害剤であるキナゾリン誘導体と、フィブラート系薬剤とを投与することにより、予想外にも、肝臓における脂肪蓄積を抑制し、かつ血中脂質を低下させることができるという驚くべき知見に基づく。

【0008】すなわち、本発明の脂肪肝の予防および／または治療剤(脂肪肝改善剤)は、ミクロソームトリグリセライド輸送タンパク質 [MTP (microsomal triglyceride transfer p

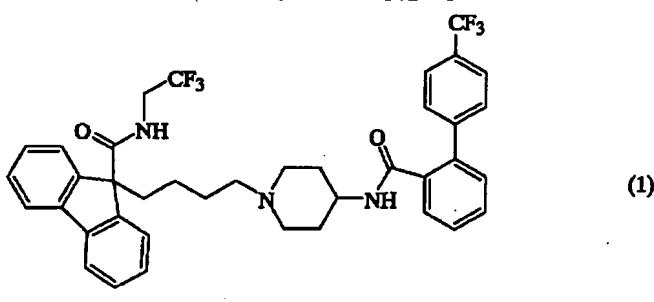
rotein)] 阻害剤の投与患者に用いられ、PPAR α (Peroxisome proliferator-activated receptor α) 活性化剤とを有効成分として含有することに1つの大きな特徴がある。本発明の予防および／または治療剤は、前記有効成分を有するため、MTP阻害剤投与患者において副作用として発現する肝臓における脂肪蓄積(脂肪肝発症)を抑制し、かつ血中脂質を低下させることができるという優れた性質を発現しうる。

【0009】脂肪肝とは、肝臓内に脂質、主に、トリグリセリド(以下、TGと記載する場合がある)などの中性脂肪が過剰に蓄積した状態、すなわち、肝細胞のほぼ半数以上に脂肪空胞が認められる状態をいう。脂肪肝は、肝臓におけるトリグリセリド合成及びVLDL(超低密度リポタンパク質)合成・分泌のいずれかの過程で障害が生じた際に発症すると考えられている。

【0010】MTP阻害剤としては、BMS201038、BMS212122、BMS197636、BMS200150、BMS192951、GR328713、CP-10447、WN-1159、BAY-13-9952、R-103757、JTT-722、あるいは国際公開第2000-05201号パンフレットに記載のN-ベンゾシクロアミド誘導体、国際公開第99-31085号パンフレットに記載の3-ビペリジル-4-オキソキナゾリン誘導体、国際公開第98-54135号パンフレットに記載のApoB分泌阻害剤、特開平11-35555号公報に記載のアミノメチル置換環状アミンなどが挙げられ、具体的には、BMS-201038、BAY13-9952、CP-10447、R-103757、WM-1159、JTT-722、GR-328713などが挙げられる。なかでも、作用効果の観点から、下記式 (1)～(5) :

【0011】

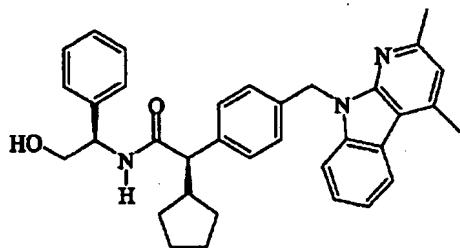
【化1】



(BMS-201038)

【0012】

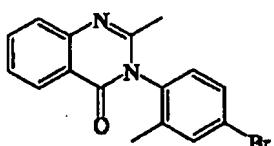
【化2】



(2)

(BAY 13-9952)

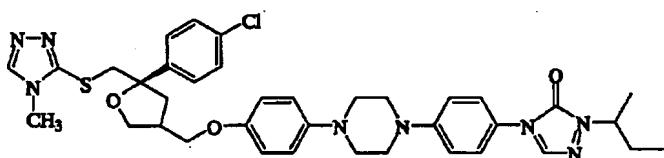
【0013】



(3)

(CP-10447)

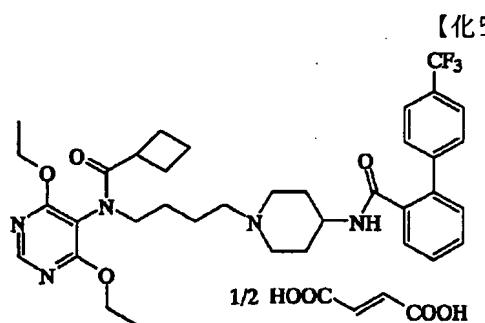
【0014】



(4)

(R 103757)

【0015】



(5)

(WM-1159)

【0016】のそれぞれで示される化合物：BMS-201038、BAY13-9952、CP-10447、R 103757およびWM-1159が好ましい。前記MTP阻害剤は、MTP阻害作用を発揮しうるものであれば、薬理上許容されうる塩であってもよい。前記薬理上許容されうる塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩などのアルカリ金属塩などが挙げられる。

【0017】本発明に用いられるPPAR α 活性化剤は、 β 酸化系を亢進させ、血清トリグリセリドを低下させる化合物であればよく、後述の実施例に記載のように、PPAR α 活性化作用のレポーター遺伝子評価系（ルシフェラーゼ遺伝子を使用）により、化合物の非添加および添加時におけるレポーター遺伝子の活性を調べることにより選別できる。

【0018】本発明に用いられるPPAR α 活性化剤と

しては、フィブラー系化合物、PPAR α およびPPAR γ のアゴニストなどが挙げられ、具体的には、例えば、フェノフィブラー、ゲンフィブロジル、クロフィブラー、ベザフィブラー、シプロフィブラー、クリノフィブラー等のフィブラー系化合物、例えば、MCC-555、KRP-297等のPPAR α およびPPAR γ のアゴニストなどが挙げられる。また、前記PPAR α 活性化剤は、PPAR α 活性化作用を発揮する化合物であれば、薬理上許容されうる塩であってもよい。前記薬理上許容されうる塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩などのアルカリ金属塩などが挙げられる。

【0019】本発明の予防および/または治療剤中におけるPPAR α 活性化剤の含有量は、患者の年齢、体重、疾患の状態などにより適宜設定され得、成人1日あたり 約10～約600mg/日であり 好ましく

は、約100～約1500mg／日となるように設定されることが望ましい。

【0020】本発明の予防および／または治療剤の薬理作用は、例えば、(1) PPAR α 活性化作用の評価系により、PPAR α 活性化作用を決定すること；(2)評価用のモデル動物における血中脂質の濃度の変化、肝臓における脂質の蓄積を決定することなどにより、評価しうる。

【0021】(1) PPAR α 活性化作用の評価系
PPAR α の活性化をレポーター遺伝子の発現により調べることが可能な細胞系を用い、レポーター遺伝子の発現により評価することができる。例えば、実施例に記載のように、①COS-1細胞に、GAL4-Luc [プラスミドpGL3-basic由来；ホタルルシフェラーゼ、コンセンサスGAL4結合配列、ウサギ β グロビンプロモーターを有する]、hPPAR α LBD/pM [ヒトPPAR α LBD、GAL4結合領域を有する]、pRL-CMV、pBluescriptを導入し、②得られた形質導入細胞に、予防および／または治療剤を供して培養し、③ルシフェラーゼ活性を測定することにより、評価することができる。

【0022】(2) 評価用のモデル動物における血中脂質の濃度の変化、肝臓における脂質の蓄積の評価
評価用のモデル動物として、例えば、高脂血症を再現しうる動物モデル、具体的には、スクロース負荷動物モデルなどを用いる。なお、前記モデル動物に用いられる動物としては、ラット、マウスなどが挙げられる。前記スクロース負荷動物モデル、特にスクロース負荷ラットモデルは、例えば、雄性、5週齢のSprague-Dawley系ラット [Crj:CD (SD)] を約2週間高スクロース食自由摂食条件にて負荷することにより得ることができる。なお、評価に使用するスクロース負荷ラットモデルを、好ましくは、血清トリグリセリド量をバラツキのないように群分けして用いることが望ましい。また、対照として用いられる正脂血動物モデル、特に正脂血ラットモデルは、雄性、6週齢のSprague-Dawley系ラット [Crj:CD (SD)、日本チャールス・リバー] を通常食 (CE-2) 自由摂食条件にて、1週間飼育することにより得ることができる。薬理評価は、より具体的には、①予防および／または治療剤を、設定した投与量で1日1回明期 (8:00～20:00) 後半に前記スクロース負荷ラットモデルおよび正脂血ラットモデルのそれぞれに強制経口投与し、②投与開始後、一定の日数経過後 (例えば、4日目、7日目の明期前半) に眼窩静脈叢より採血し、血清パラメーターを測定し、③投与最終日 (例えば、7日目) に肝臓を摘出し、脂質を抽出して肝臓中脂質を測定すること、により行なわれる。ここで、化合物非添加時に比べて添加時において、血中脂質の濃度を減少させ、かつ肝臓における脂質の蓄積を抑制もしくは低減する化合物が

本発明の範囲に含まれる。

【0023】本発明の予防および／または治療剤の投与形態は、その製剤形態、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度等に応じて決定され、経口投与及び非経口投与のいずれでもよい。患者における利便性の観点から、経口投与が好ましい。

【0024】経口投与のためには、本発明の予防および／または治療剤を、例えば、粉末、顆粒剤、錠剤、ピル、カプセル剤、液剤及びシロップ剤の単位投与形態として用いることができる。

【0025】また、非経口投与のためには、本発明の予防および／または治療剤を、例えば、注射剤、坐剤等の単位投与形態として用いることができる。前記注射剤は、単独で又はブドウ糖、アミノ酸等の通常の補助剤と混合して静脈内投与され、更に必要に応じて単独で筋肉内、皮内、皮下もしくは腹腔内投与されうる。坐剤は、直腸内投与されうる。

【0026】皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与のためには、本発明の予防および／または治療剤を、水性担体 (慣用の注射用水など) 又は非水性担体 (慣用の油性溶剤、親水性溶剤など) の中に溶解又は懸濁させた形態として用いることができる。

【0027】さらに、本発明の予防および／または治療剤は、コラーゲン等の生体親和性の材料を用いて、徐放性製剤として投与されうる。

【0028】静脈投与のためには、本発明の予防および／または治療剤は、薬理上許容される担体、好ましくは水性担体の中に溶解又は懸濁させた形態として用いることができる。前記水性担体としては、例えば、水、緩衝化水、生理的食塩水などを使用することができる。このようにして作製された水溶液については、そのまま包装するか、あるいは凍結乾燥することができ、凍結乾燥した調製物については、投与前に無菌の水溶液に溶解させて使用することができる。

【0029】本発明の予防および／または治療剤は、薬理上許容される補助剤をさらに含有してもよい。前記補助剤としては、例えば、賦形剤、緩衝化剤、張度調節剤、浸潤剤、結合剤、充填剤、安定剤、矯味矯臭剤などが挙げられる。より具体的には、本発明の予防および／または治療剤は、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレエート、单シロップ、ゼラチン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、グリセリン、D-マンニトールなどを含有してもよい。

【0030】例えば、本発明の予防および／または治療剤は、経口投与用の錠剤又はカプセル剤として、前記のような投与量の投与用の単位投与剤として提供される。かかる単位投与剤は、前記有効成分に、結合剤、充填

剤、希釈剤、打錠剤、滑沢剤、崩壊剤、着色剤、矯味矯臭剤、温潤剤などの補助剤を添加して製造することができる。錠剤は、例えば、慣用のコーティング剤を用いてコーティングすることができ、例えば、セルロース、マンニトール、ラクトースなどの充填剤；デンプン誘導体、ポリビニルポリビロイドなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤；ラウリル硫酸ナトリウムなどの温潤剤などを用いて、混合、充填、又は打錠などにより製造することができる。

【0031】本発明の予防および／または治療剤を経口投与用の液剤として用いる場合、かかる液剤は、例えば、水性又は油性懸濁液、溶液、エマルジョン、シロップ剤など、あるいは投与前に、水（滅菌・蒸留水など）又は適当な媒体により再溶解されうる乾燥製剤として提供される。かかる液剤には、通常の添加剤、例えばソルビトール、シロップ、メチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ステアリン酸アルミニウムゲルなどの沈澱防止剤；レシチン、ソルビタンモノオレート、アラビアゴムなどの乳化剤；オリーブ油、エチルアルコールなどの油性又は非水性媒体；p-ヒドロキシ安息香酸のメチルエステル、エチルエステル若しくはプロピルエステル、ソルビン酸などの保存剤；着色剤；矯味矯臭剤などを配合してもよい。

【0032】また、本発明の予防および／または治療剤においては、薬物送達用素材も適宜用いてもよい。

【0033】また、MTP阻害剤とPPAR α 活性化剤とを有効成分とすることにより、血液中の脂質濃度を減少させ、かつ肝臓における脂質の蓄積を抑制することができる。したがって、かかる有効成分を含有した薬剤は、高脂血症治療剤として有用である。かかる高脂血症治療剤も本発明の範囲に含まれる。

【0034】本発明に用いられるMTP阻害剤としては、トリグリセリドを低下させる活性を有する化合物であればよい。かかる化合物の活性は、後述の実施例におけるMTP阻害作用の評価系に記載するように、人工膜間トリグリセリド輸送活性と、apoB分泌阻害活性〔例えば、J. Lipid Res., 37, 1498 (1996)〕で評価できる。

【0035】本発明において、MTP阻害剤としては、人工膜間トリグリセリド輸送活性のIC₅₀が、数nM～数μMであり、好ましくは1nM～2μMであり、また、HepG2のapoB分泌阻害活性のIC₅₀が、数nM～数μMであり、好ましくは1nM～5μMであることが望ましい。

【0036】かかるMTP阻害剤としては、前記と同様の化合物（BMS-201038、BAY13-9952、CP-10447、R 103757、WM-1159、これらの薬理上許容されうる塩など）が挙げられる。

【0037】本発明の高脂血症治療剤中におけるMTP阻害剤の含有量は、患者の年齢、体重、疾患の状態などにより適宜設定され得、成人体重1kgあたり、好ましくは、約0.01mg～約100mg/kg、より好ましくは、約0.1mg～約75mg/kgの投与量となるように設定されることが望ましい。

【0038】本発明に用いられるPPAR α 活性化剤としては、前記と同様の化合物（フェノフィブラーート、ゲンフィブロジル、クロフィブラーート、ベザフィブラーート、シプロフィブラーート、クリノフィブラーート、これらの薬理上許容されうる塩など）が挙げられる。

【0039】本発明の高脂血症治療剤中におけるPPAR α 活性化剤の含有量は、患者の年齢、体重、疾患の状態などにより適宜設定され得、成人1日あたり約10～約6000mg/日であり、好ましくは、約100～約1500mg/日となるように設定されることが望ましい。

【0040】また、本発明の高脂血症治療剤中におけるMTP阻害剤とPPAR α 活性化剤との存在比〔MTP阻害剤/PPAR α 活性化剤（モル比）〕は、適宜患者の病症に対応して選択することができる。例えば、存在比1以下を選択することができる。

【0041】本発明の高脂血症治療剤の投与形態、剤形などは、患者の年齢、体重、疾患の状態などにより適宜設定することができ、例えば、前記脂肪肝の予防および／または治療剤と同様のものが挙げられる。

【0042】本発明の高脂血症治療剤の薬理作用は、例えば、前記（1）PPAR α 活性化作用の評価系と（3）MTP阻害作用の評価系とにより、MTP阻害作用およびPPAR α 活性化作用を決定すること；前記（2）評価用のモデル動物における血中脂質の濃度の変化、肝臓における脂質の蓄積を決定することなどにより、評価しうる。前記（1）と（2）の評価法は、前記脂肪肝の予防および／または治療剤における薬理評価の記載が参照される。前記（3）の評価系としては、例えば、下記の評価系が挙げられる。

【0043】（3）MTP阻害作用の評価系
Triton誘発高グリセリド血症（高脂血症）動物モデルを用い、①適当な期間絶食させた動物に、予防および／または治療剤を投与し、②ついで、Tritonを静脈内投与し、③経時に採血して血清トリグリセリドを測定して、投与前および／または非投与の場合に比べ、投与した場合にトリグリセリド値を低下させることを指標とする。

【0044】前記Triton誘発高グリセリド血症モデルとは、Tritonを静脈内に投与することによりトリグリセリドの代謝を抑制し、それにより高トリグリセリド血症を誘発するモデル動物をいう。かかるモデル動物については、例えば、イシカワ（Ishikawa）ら J. Lipid Res. 20, 254-264

(1979)を参照することができる。

【0045】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はかかる実施例により何ら限定されるものではない。

【0046】実施例1 MTP活性阻害作用およびPPAR α 活性化作用の評価

(1) MTP活性阻害作用の評価

MTP活性阻害作用に基づくVLDL分泌抑制作用を、Triton誘発高トリグリセリド血症モデルラットを用いて評価した。前記モデルラットに関して、〔イシカワ(Ishikawa)ら、J. Lipid Res. 20, 254-264, (1979)〕を参照した。具体的には、以下の通りである。

【0047】雄性、5週齢のSprague-Dawley系ラット [Crj:CD (SD)、日本チャールスリバー社製] を1週間予備飼育した。飼育期間中、前記ラットに、CE-2 固形試料(日本クレア社製)を自由摂食させた。

【0048】ついで、予備飼育後のラットについて、18時間以上絶食させ、ついで、被検化合物としてMTP阻害剤(BMS-201038、BAY13-9952、CP-10447、R 103757およびWM-1159)を経口投与する。投与適時(例えば1時間後)に、各ラットにTriton WR-1339(ナカライトスク社製)300mg/kgを尾静脈内投与し、経時に眼窩静脈叢より採血する。なお、対照として、ビヒクル単独を投与する。

【0049】その後、採血された血液について、遠心分離し、血清を分離する。得られた血清について、測定キット[商品名:トリグリセライド E-テスト、和光純薬(株)社製]を用いて血清トリグリセリド値を測定する。

【0050】その結果、対照に比べて、被検化合物投与における血清トリグリセリド値が低下していることにより、該被検化合物が、MTP活性阻害作用に基づくVLDL分泌抑制作用を有することがわかる。

【0051】(2) PPAR α 活性化作用の評価

COS-1細胞を、24ウェルプレートに 1.25×10^4 細胞/ $500\mu l$ /ウェル($=\sim 3 \times 10^5$ 細胞/プレート)で播き、翌日リポフェクション法により遺伝子導入した。遺伝子導入は、TransIT (商標登録)-LT1 (PANVERA)を用い、製造者の添付のプロトコールに従った。培地として、無血清 RPMI

1640培地を用いた。

【0052】評価系の遺伝子導入処理時のプラスミド添加量は、1ウェルあたりGAL4-Luc (プラスミド pGL3-basic由来; ホタルルシフェラーゼ、コンセンサスGAL4結合配列、ウサギ β グロビンプロモーターを有する; 0.05 μg)、hPPAR α LBD/pM (ヒトPPAR α LBD、GAL4結合領域を有する; 0.005 μg)、pRL-CMW (0.0025 μg)、pBluescript (0.4425 μg)とした。

【0053】遺伝子導入処理4時間後に細胞を洗浄し、5重量%活性炭処理ウシ血清-10-8M インスリン含有DMEM(フェノールレッド無し)に置換した。さらに、被検化合物:クリノフィブラーート、WY-14643(Cayman社製)、ベザフィブラーート(SIGMA社製)、フェノフィブラーート(SIGMA社製、カルボン酸型に分解後使用)もしくはクロフィブラーート(ALDRICH社製)を溶解したDMSO溶液または8(S)-HETE(Cayman社製)を溶解したエタノール溶液を細胞に添加し、24時間培養を行なった。

【0054】以下、Dual-Luciferase Reporter Assay System(プロメガ社製)の標準プロトコールに従い、100 μl の細胞融解液で処理した後にルシフェラーゼ活性を測定した。ホタルルシフェラーゼ活性/ウミシイタケルシフェラーゼ活性を算出し、被検化合物未処置細胞の値に対する倍率を算出した。

【0055】PPAR α 活性化作用評価の陽性対照として、種々のフィブラーート系化合物の他、生体内リガンドの一つと考えられている脂質である8(S)-HETEを用いて、PPAR α 活性化作用の評価系の検討を行なった。なお、化合物のPPAR α 活性化作用は、陽性対照として用いたWY-14643の30 μM 処置時のルシフェラーゼ活性上昇幅を100とし、各化合物処置時の活性上昇分を数値化した。クリノフィブラーート、WY-14643(Cayman社製)、ベザフィブラーート(SIGMA社製)、フェノフィブラーート(SIGMA、カルボン酸型に分解後使用)およびクロフィブラーート(ALDRICH)のPPAR α 活性化作用について、同様に数値化した評価結果を表1および表2に示す。

【0056】

【表1】

	10 μM	30 μM	100 μM
WY-14643	21	100	-
クリノフィブレート	0	1	20
クロフィブレート	3	16	53
ペダフィブレート	9	31	70
フェノフィブレート	32	161	ND

【0057】

【表2】

	0.1 μg/ml	0.3 μg/ml
8(S)-HETE	43	99

【0058】表1および表2の結果から、かかる評価系によりPPAR α 活性化作用を評価できることがわかる。

【0059】実施例2

雄性、5週齢のSprague-Dawley系ラット(Crl : CD (SD)、日本チャールスリバー社製)を約2週間高スクロース食(HIGH SUCROSE AIN-76A DIET、PURINA MILL S, INC. (日本SLC取り扱い))自由摂食条件下で前負荷した。得られたラットを、スクロース負荷ラットモデルとして用いた。

【0060】スクロース負荷ラットモデルを、各群6匹で血清トリグリセリド量にバラツキの無いように群分けした。BMS-201038、BAY13-9952またはクリノフィブレートを、表5および表6に示される投与量で1日1回明期(8:00~20:00)後半に強制経口投与した。なお、溶媒は、0.5重量%メチセルロースとし、5ml/kgとなるように投与した。

【0061】投与開始後4日目、7日目の明期前半に眼窩静脈叢より採血し、血清パラメーターを測定した。また、最終日7日目に肝臓を摘出し、脂質を抽出して肝臓中脂質を測定した。

【0062】一方、雄性、6週齢のSprague-Dawley系ラット(Crl : CD (SD)、日本チャールスリバー社製)を通常食(CE-2)自由摂食条件

正脂血ラットモデルにおける脂質低下作用の評価(7日)

n	血清トリグリセリド(mg/dl)	TG抑制率(%)	血清コレステロール(mg/dl)	TC抑制率(%)
ビヒクル単独	4	178.5 ± 8.0	-	73.3 ± 6.4
BAY13-9952 30 mg/kg	4	110.3 ± 27.2	38	60.5 ± 4.3
	4	26.3 ± 9.3	85	31.3 ± 5.8
BMS-201038 3 mg/kg	3	78.7 ± 8.8	56	59.7 ± 5.9
	4	54.3 ± 4.1	70	27.5 ± 3.5
				62

【0067】

【表4】

正脂血ラットモデルの肝臓における脂質量(7日)

	<i>n</i>	肝トリグリセリド(mg/g)	(倍率)	肝コレステロール(mg/g)	(倍率)
ビヒクル単独	4	13.2 ± 1.1	-	2.3 ± 0.1	-
BAY13-9952 30 mg/kg	4	32.8 ± 2.1	2.5	2.8 ± 0.1	1.2
	100 mg/kg	49.6 ± 9.5	3.8	3.0 ± 0.2	1.3
BMS-201038 3 mg/kg	3	55.0 ± 1.4	4.2	3.6 ± 0.3	1.5
	10 mg/kg	69.5 ± 8.5	5.3	3.4 ± 0.1	1.5

【0068】

【表5】

高スクロース負荷ラットにおける脂質低下作用(7日)

	<i>n</i>	血清トリグリセリド(mg/dl)	TG抑制率(%)	血清コレステロール(mg/dl)	TC抑制率(%)
ビヒクル単独	6	221.8 ± 37.6	-	105.3 ± 9.5	-
BAY13-9952 1 mg/kg	5	264.0 ± 13.9	-19	92.6 ± 9.2	12
	6	112.8 ± 25.4	49	57.3 ± 2.9	46
クリノフィブラーート 30 mg/kg	6	64.5 ± 4.8	71	58.8 ± 5.5	44
	6	23.0 ± 5.2	90	32.8 ± 3.7	69
BAY13-9952 10 mg/kg + クリノフィブラーート 30 mg/kg	6	110.3 ± 14.8	50	64.7 ± 3.2	39

【0069】

【表6】

高スクロース負荷ラットの肝臓における脂質量(7日)

	<i>n</i>	肝トリグリセリド(mg/g)	(倍数)	肝コレステロール(mg/g)	(倍数)
ビヒクル単独	6	27.8 ± 6.0	-	2.5 ± 0.1	-
BAY13-9952 1 mg/kg	5	28.8 ± 4.5	1.0	2.7 ± 0.1	1.1
	6	85.9 ± 9.4	3.1	3.3 ± 0.1	1.3
クリノフィブラーート 30 mg/kg	6	9.9 ± 1.1	0.4	2.4 ± 0.2	1.0
	6	24.6 ± 3.6	0.9	3.4 ± 0.3	1.3
BAY13-9952 10 mg/kg + クリノフィブラーート 30 mg/kg	6	148.9 ± 10.7	5.4	4.2 ± 0.1	1.7

【0070】表3および表4に示すように、正脂血ラットモデルにおいて、スクロース負荷ラットモデルにおける薬効発現用量の10倍量の薬剤を用いた場合、血清トリグリセリド量は低下するが、肝臓においてトリグリセリドが蓄積することがわかる。

【0071】一方、表5および表6に示すように、肝臓においてβ酸化を亢進し、かつPPAR α 活性化作用を有するとされるフィブラーート系薬剤との併用は、単独投与に比べてより強力な血清脂質低下作用を示すとともに、肝脂肪蓄積を顕著に軽減し、肝トリグリセリドについては正常レベルとなっている。PPAR α 活性化作用のような、積極的にβ酸化を亢進する作用を付加する方向性の有効性が示唆された。

【0072】正常の代謝レベルである正脂血ラットモデルにおいても、スクロース負荷ラットモデルでの薬効発現用量の10倍用量から、ある程度の差はあるもののBAY、BMS両薬剤でやはり明確な蓄積傾向を認め、ラットに関しては少なくとも肝脂肪蓄積発現と薬効発現と

の乖離が10倍以下であると考えられた。スクロース負荷モデルに比べると肝脂肪含量は少ないものの、肝脂肪蓄積の可能性は否定しきれない。

【0073】以上より、MTP阻害剤と、PPAR α 活性化作用に基づくβ酸化亢進作用を有するとされるフィブラーート系薬剤との併用により、より強力な血清脂質低下作用を示し、かつ肝脂肪蓄積が著減することが示される。

【0074】

【発明の効果】本発明の脂肪肝の予防および/または治療剤によれば、肝臓における脂肪蓄積を予防もしくは治療することができ、かつ血中脂質を低下させることができるという優れた効果を奏する。また、本発明の高脂血症治療剤によれば、肝臓への脂肪の蓄積（脂肪肝発症）を抑制しつつ、血中脂質の濃度を低下させることができ、それにより高脂血症を治療することができるという優れた効果を奏する。

(10) 02-220345 (P2002-45

フロントページの続き

(51) Int.C1. ⁷	識別記号	F I	マーク (参考)
A 6 1 K	31/496	A 6 1 K	31/496
	31/513		31/513
	45/06		45/06
A 6 1 P	1/16	A 6 1 P	1/16
	3/06		3/06

(72)発明者 田中 正史
大阪市此花区春日出中3-1-98 住友製
薬株式会社内

F ターム(参考) 4C084 AA17 AA20 MA02 NA06 NA14
ZA751 ZA752 ZC331 ZC332
ZC751
4C086 AA01 AA02 BC21 BC42 BC60
CB05 GA02 GA07 GA12 MA01
MA02 MA04 MA09 NA06 NA07
NA14 ZA75 ZC33 ZC75
4C206 AA01 AA02 DA28 DB25 DB43
GA09 GA28 KA01 MA01 MA02
MA04 NA06 NA07 ZA75 ZC33
ZC75